

AA

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-145189

(43)Date of publication of application : 24.05.1994

(51)Int.Cl.

C07H 15/04
 C07H 1/08
 C07H 15/26
 C12P 19/44
 // A61K 31/70
 (C12P 19/44
 C12R 1:01)

(21)Application number : 03-006344

(71)Applicant : KITASATO INST:THE
KIBUN FOODS INC

(22)Date of filing : 23.01.1991

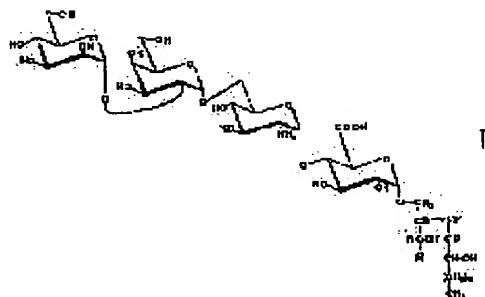
(72)Inventor : KAWAHARA KAZUYOSHI

(54) GLYCOSPHINGOLIPID

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new compound useful as an immunostimulating agent, etc., owing to its differentiation-inducing action on animal cell and stimulating action on B cell.

CONSTITUTION: The glycosphingolipid of formula I (R is group of formula II or formula III). The compound can be produced by culturing *Sphingomonas paucimobilis* [e.g. *Sphingomonas paucimobilis* KK0001 (FERM P-11820)] to collect a large amount of cells, freeze drying the cells, extracting the cells successively with acetone and chloroform/methanol (2:1 V/V), separating into a solvent fraction and the cell residue, extracting the cell residue with chloroform/methanol (1:3 V/V), subjecting the obtained crude extract fraction to silica gel chromatography treatment, eluting with mixed solvents of chloroform/methanol at mixing ratios of 2:1, 1:1 and 1:3 and separating the objective compound from the fraction eluted by the 1:3 mixed solvent.



II



III

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

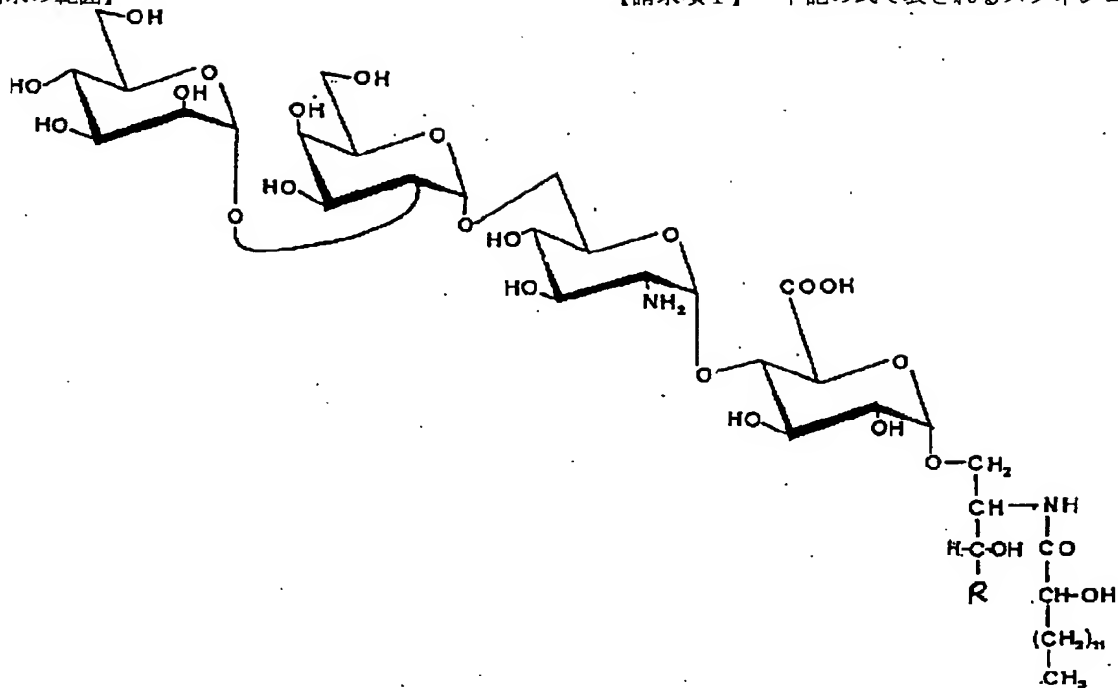
Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(11)特許出願公開番号

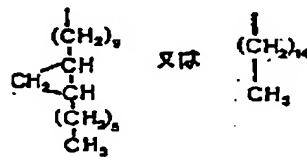
(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

である。)

【特許請求の範囲】



(式中Rは



である。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は免疫賦活活性を有する新規なスフィンゴ糖脂質に関する。

【0002】

【従来の技術】スフィンゴ糖脂質は動物細胞等の表層に存在している物質で、細胞同士の認識機構に関与するものと考えられている。一方、グラム陰性細菌はその細胞表層に、リポ多糖、蛋白質及びリン脂質よりなる外膜を持っており、これを介して外界とのやりとりを行っている。従って、外膜の主要成分であるリポ多糖は全てのグラム陰性菌に共通に存在し、必須なものであると考えられてきた。ところが、好気性グラム陰性菌で、日和見感染菌の1種でありこれまでシュドモナス パウシモビリス (*Pseudomonas paucimobilis*)と呼ばれていた菌は、リポ多糖の主要脂肪酸である3-ヒドロキシ脂肪酸を全く保有しないことが知られていた。この菌は菌体脂質としてスフィンゴ糖脂質を含有していること、及び他の多くの分類学的特性も典型的なシュドモナス属菌とは異なるため、最近になってスフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属が提唱されている。スフィンゴモナス パウシモビリス (*Sphingomonas paucimobilis*)は極めて特殊なリポ多糖か、あるいはそれに代わる糖脂質を有していることが予想された。

【請求項1】 下記の式で表されるスフィンゴ糖脂質。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記の菌体から糖脂質を単離し、その化学構造を解析すると共に、生物活性を調べるにより、有用な生物活性をもつ新規なスフィンゴ糖脂質を得ることを目的としている。

【0004】

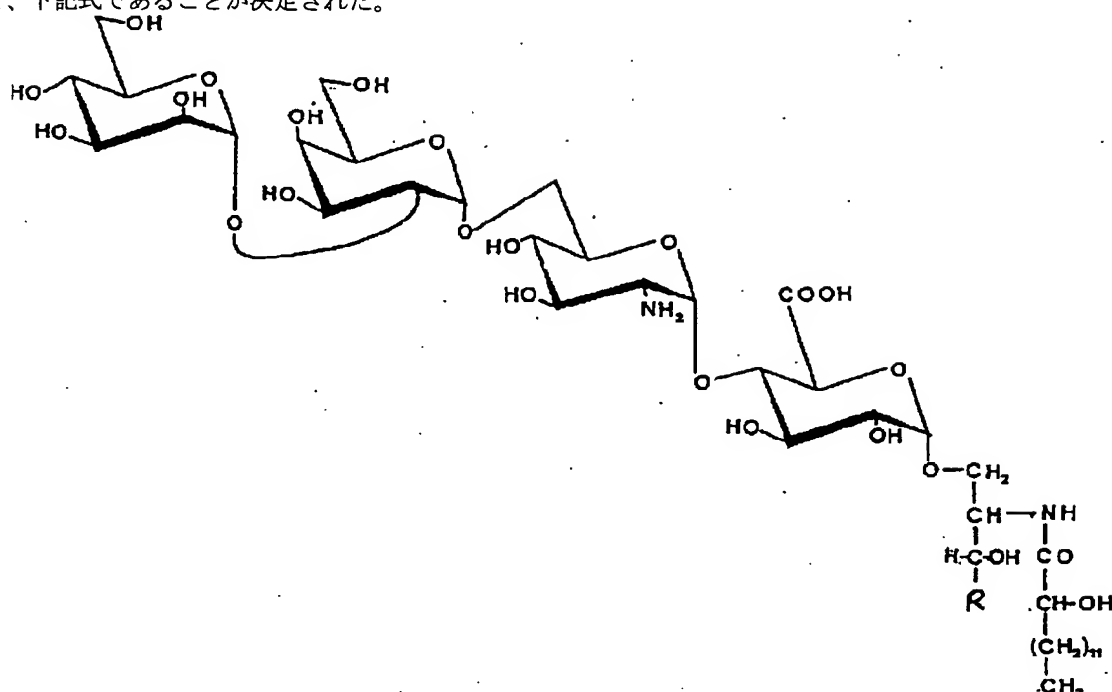
【課題を解決するための手段】発明者等はスフィンゴモナス属の細菌の細胞膜を有機溶剤での抽出、カラムクロマトグラフィ等の処理工程を適宜選択し組み合わせることにより、目的の新規なスフィンゴ糖脂質を単離、同定することに成功した。

【0005】スフィンゴモナス パウシモビリスを適当な培地を用いて培養し、多量の菌体を得、凍結乾燥する。次いで、乾燥菌体をアセトン、クロロホルム/メタノール (2:1、v/v) で順次抽出し、溶媒画分と菌体残渣とに分画する。次ぎに、菌体残渣をクロロホルム/メタノール (1:3、v/v) で抽出し、粗抽出画分をえる。この画分をシリカゲルのクロマトグラフィーで精製し、クロロホルム/メタノール (2:1)、(1:1)、(1:3)のそれぞれ混合比の異なる混合溶剤で溶出を行い、混合溶剤 (1:3)の溶出画分に所期の精製糖脂質を得る。

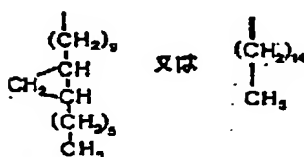
【0006】得られた精製糖脂質は薄層クロマトグラフィーにより単一の物質であることが、確認された (図2

レーン4)。更に、化学構造を後に述べるような手法で解析して、下記式であることが決定された。

【0007】



(式中Rは



である。)

【0008】本発明で得られた糖脂質は従来のリポ多糖がもつエンドトキシン活性が全くみられなかった。一方、B細胞マイトジェン活性を有するが、リポ多糖非応答性のマウスにおいても活性を示すという従来のリポ多糖のものとは性質が異なるものであることが判った。

【0009】従って、本発明の目的化合物はB細胞の賦活化作用及び動物細胞の分化誘導作用を示し、免疫賦活剤としての用途が期待されている。

【0010】本発明を実施例により、さらに詳細に説明する。

【0011】

【実施例】

1. 使用菌株と培養：スフィンゴモナス パウシモビルス KK0001 (微工研菌寄第11820号：FERM P-11820)、同 KK0002 (微工研菌寄第11821号：FERM P-11821)、同 KK0003 (微工研菌寄第11822号：FERM P-11822)、同 KK0004 (微工研菌寄第11823号：FERM P-11823) の各菌株を使用した。培養はグルコース 1%；酵母エキス 0.5%；カザミノ酸 0.5%； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%； K_2HPO_4 0.2%； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%の培地を用いて各菌株をジャーファーメンター

により30℃、24時間培養した。得られた培養液を遠心分離して菌体を回収し、凍結乾燥した。

【0012】2. 抽出と精製：凍結乾燥菌体をアセトンで、次いでクロロホルム/メタノール (C/M) (2:1, v/v) で抽出し、溶媒画分と菌体残渣とに分画した。次ぎに、菌体残渣をC/M (1:3, v/v) により80℃で1時間の条件で抽出し、粗抽出画分を得た。これをシリカゲル (シリカゲル60、メルク社、70-230メッシュ) のカラムクロマトグラフィーにより精製した。溶出にはC/M (2:1, v/v)、C/M (1:1, v/v)、C/M (1:3, v/v) を用い、C/M (1:3, v/v) 溶出画分から精製脂質を回収した。

【0013】3. 化学組成分析及び同定：

1) TLC分析：上記の精製工程の途中で得られた粗抽出画分とシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた精製糖脂質とをシリカゲル60アルミプレート (メルク社) を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析した。展開液にはクロロホルム/メタノール/酢酸/水 (25:15:4:2) を用いた。

【0014】この粗抽出画分の分析結果を図1に、各抽出画分に含まれる脂質と精製糖脂質の分析結果を図2に示した。培養した各菌株から抽出された各粗抽出画分

は、図のTLC分析の結果から明らかなように、矢印で示される位置に糖脂質を含んでいることが判った。

【0015】また、図2に示されるTLC分析結果では精製糖脂質（レーン4）は単一のスポットとして現れ、このスポットは図1の矢印で示すスポットに相当することが判った。尚、レーン1は培養菌体のアセトン抽出液、レーン2はC/M（2：1，v/v）抽出液、そしてレーン3は粗精製糖脂質（図1と同一成分）のスポットを示す。

2）化学組成の分析：脂肪酸部分の分析は、4N HCl 10
1による100℃、5時間の加水分解の後メチルエステ

ル化し、ガスクロマトグラフィー（GLC）で行った。中性糖は0.1N HClによる100℃、48時間の加水分解の後、アセチルアルジトール誘導体にしてGLCで分析した。GLCのカラムにはCBP-1（島津製、25m、内径0.2mm）を用いた。アミノ糖はフェニルイソチオカルバミル誘導体として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用して分析を行った。HPLCによる分析はODSカラムを用いて行った。ウロン酸の定量にはカルバゾール硫酸法を用いた。

【0016】結果を表1に示す。

表1
精製糖脂質の化学組成

成 分	$\mu\text{mol}/\text{mg}$
2-ハイドロキシミリスチン酸	0.74 a
グルコサミン	0.60 b
マンノース	0.64 c
ガラクトース	0.53 c
ウロン酸	0.38

注： a：全てが塩基安定性の形態であった。即ち、アミド結合体であった。

b：グルコサミンはMorgan-Elson法により測定されHPLC及びGLCで同定された。

【0017】c：アセチルアルジトール誘導体として、GLCにより測定された。

【0018】3）強酸分解により遊離される二糖の同定：精製糖脂質を4N HClにより100℃、5時間加水分解し、分解物を高圧ろ紙電気泳動（HVPE）により分析した。HVPEはピリジン/酢酸/水/ギ酸（1：10：90：約3，v/v）（pH2.8）の緩衝液を用い、1500V、2.5時間の条件で行った。

【0019】結果は図3に示す。上記の加水分解物の分析結果はレーン1に示される。

【0020】レーン1の3つのスポットの内、レーン2に示された中間のスポットはニンヒドリン陽性の未知の物質であった。この未知の物質をろ紙から抽出し、N-アセチル化した後、HVPE分析してレーン3のスポットを得た。

【0021】このHVPE分析の結果から、この未知物質はアミノ基とカルボキシル基を持つことが判った。

【0022】上記の未知物質をN-アセチル化した後、NaBD₄を用いて還元し、更に箱守法の改良法によって完全メチル化した。得られた誘導体はマススペクトル（化学イオン化法）により分子量526であることが判った。また、この物質をマススペクトル（電子衝撃法）で分析したところ、図4のようなフラグメントパターンを示した。この図4から元の物質は非還元末端のグルコサミンと還元末端側のウロン酸より成る二糖であることが判った。

【0023】次に、メチル化二糖のカルボキシル基を還

元して水酸基にした後、2Nトリフルオロ酢酸（TFA）を用いて120℃で2時間加水分解し、アセチル化した。得られたウロン酸由来のピークをガスクロマトグラフィー/マススペクトル（GC/MS）分析して、図5を得た。図5に示されるように、4, 6-Ac-1, 2, 3, 5-Me-ヘキシトールをしめすマススペクトルが得られた。一方、加水分解後、再メチル化した場合には、完全メチル化ヘキシトールが得られたが、この物質はGLCの保持時間による同定の結果、メチル化グルシトールであることが判った。以上の結果から、本発明の目的物質である糖脂質の4N HCl加水分解物の1つはGl c N-1, 4-Gl c Aと同定された。

【0024】4）オリゴ糖のメチル化分析：目的物質である糖脂質のオリゴ糖部分を調べるためにヒドラジン分解（103℃、40時間）を行い、得られたオリゴ糖をN-アセチル化し、還元し、次いで完全メチル化した。次に、カルボキシル基を還元した後、1N TFAで120℃、2時間加水分解し、還元、アセチル化の後にGC-MS分析を行った。この結果1, 5-Ac-2, 3, 4, 6-Me-マンニトール、1, 2, 5-Ac-3, 4, 6-Me-ガラクトール及び1, 5, 6-Ac-3, 4-Me-2-デオキシ-2-（N-Me, Ac）-グルシトールが検出された。従って、マンノースは糖鎖の非還元末端、ガラクトースは2位置換、グルコサミンは6位置換型であることが判明した。

【0025】5）精製糖脂質のNMR分析：精製糖脂質をCDCl₃/methanol-d₄/D₂O（1:3:0.1，v/v）に溶かし、360MHzの¹H-NMR及び¹³C-NMRで分析したところ、アノメリック領域のシグナルの分析から4つのグリコシド結合はすべてα結合であることが示された。またスフィンゴシン残基が存在し、2-ハイドロキ

シミリスチン酸とセラミドを構成していることが示唆された。

【0026】6) スフィンゴシンの同定：精製糖脂質を0.2N HCl/メタノールで65℃、5時間加水分解し、スフィンゴシンを遊離させた。これをPb (I V) OAc₄で酸化後LiAlH₄で還元し、得られた長鎖アルコールをニコチン酸エステルにした後、マススペ

表2

致死毒性	— a
トレランスの誘導能	— a
TNFの誘導活性	—
リムルス活性	— b
B-細胞マイトジェン活性	+

注：a； ガラクトサミン感作C57BL/6マウスを使用した。トレランス誘導能試験ではLPSを3時間後に注射した。

b； トキシカラーシステム（生化学工業製造）を使用した。

【0028】目的物質の致死活性を調べたところ、マウス当たり10μgで全く活性を示さなかった。致死毒性に対するトレランスの誘導能についてはマウス当たり50μgまで活性が見られなかった。TNFの誘導活性についてもマウス当たり50μgまで調べたが誘導能は検出されなかった。リムルス活性については、トキシカラーシステムにおいて10μg/mlの濃度で若干の発色が見られたが、サルモネラリポ多糖に比べ10⁶倍以上の感度の差が見られた。

【0029】B細胞マイトジェン活性が見られたので、リポ多糖応答性のマウスと非応答性のマウスを用いてさらに詳しく調べたところ、両マウスに同程度の活性を示した。

【0030】

【発明の効果】本発明で単離、同定された新規な化合物

クトル分析（電子衝撃法）した。その結果、糖脂質に含まれるスフィンゴシンはC₁₈-スフィンガニンと13, 14-cis-メチレンC₂₀-スフィンガニンとの混合物（混合比、約1：1）であることが判った。

【0027】実験例：生物活性試験

本発明の目的物質の生物活性及び毒性を測定し、その結果を表2にまとめた。

は細胞の分化誘導能を示し、この作用を利用した試薬として使用できる。また、この化合物はB細胞の賦活剤としても利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で得た培養菌体を溶剤抽出した後、C/M（1：3，v/v）で抽出し、抽出画分を薄層クロマトグラフィー分析した結果を示す図である。

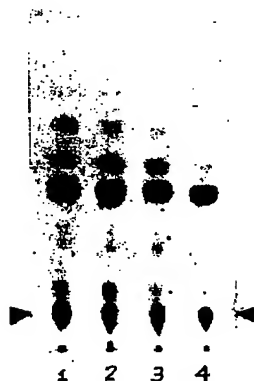
【図2】実施例で得た培養菌体から溶剤抽出とシリカゲルクロマトグラフィーとにより精製した糖脂質を薄層クロマトグラフィー分析した結果を示す図である。

【図3】精製糖脂質の4N HCl加水分解物の高圧ろ紙電気泳動分析の結果を示す図である。

【図4】精製糖脂質の4N HCl加水分解物から単離した完全メチル化二糖のマススペクトル（電子衝撃法）分析によって得られたチャートである。

【図5】完全メチル化二糖のカルボキシル基を還元し、トリフルオロ酢酸で加水分解し、アセチル化して得られるウロン酸由来の物質のマススペクトル（電子衝撃法）分析によって得られたチャートである。

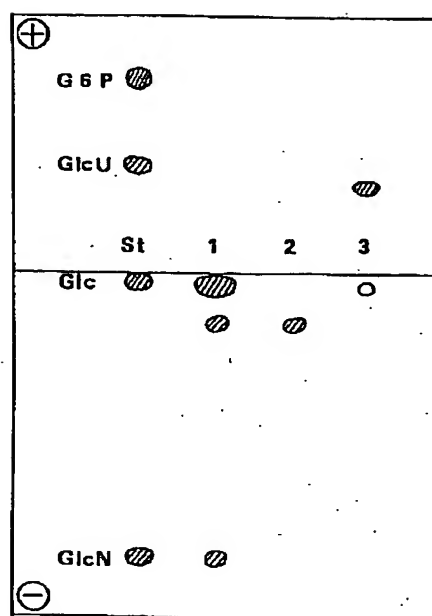
【図1】



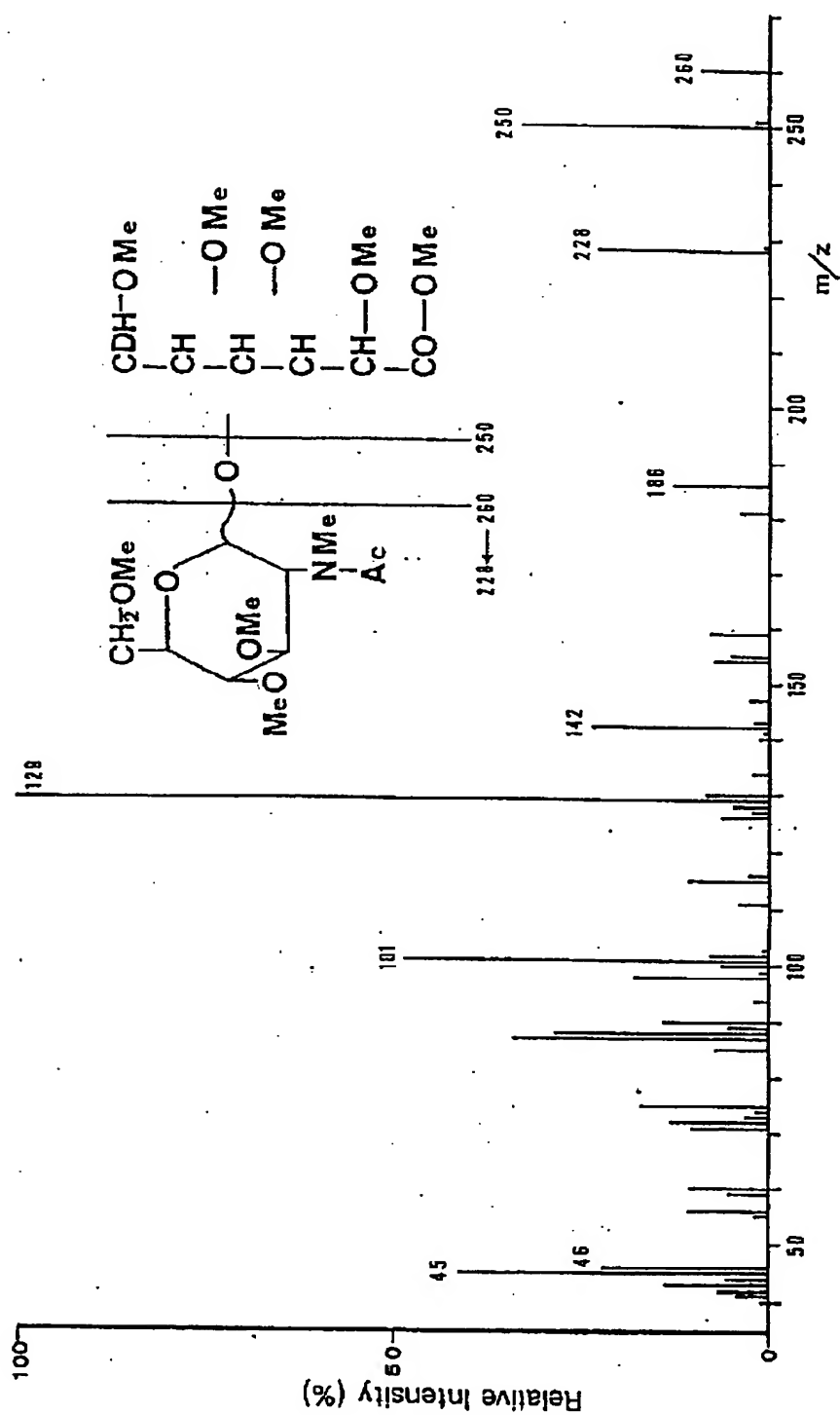
【図2】



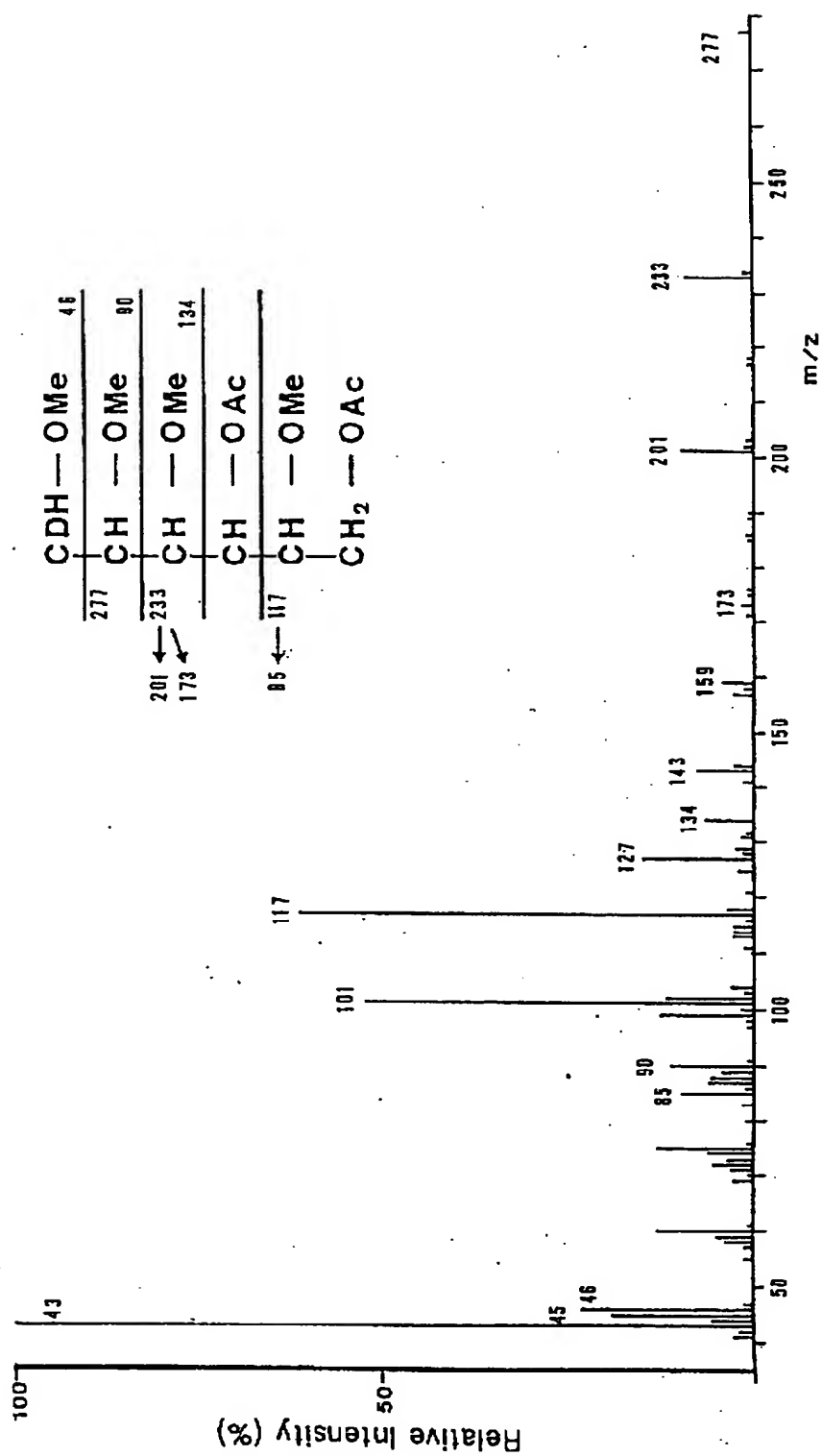
【図3】



Relative intensity (%)



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 19/44

C 1 2 R 1:01)